

日 本 国 特 許 庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

20.04.99

ES U

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

09/674377

出 願 年 月 日
Date of Application:

1998年 4月28日

REC'D 14 JUN 1999

WIPO PCT

出 願 番 号
Application Number:

平成10年特許願第134681号

出 願 人
Applicant (s):

中村 敏一

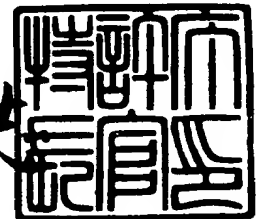
PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

1999年 5月28日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

山 佐 健 一



出証番号 出証特平11-3033315

【書類名】 特許願
【整理番号】 388JP
【提出日】 平成10年 4月28日
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C07K 14/475
【発明の名称】 血管新生抑制剤
【請求項の数】 3
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府高槻市高見台 4-1
 【氏名】 中村 敏一
【特許出願人】
 【識別番号】 591115073
 【住所又は居所】 大阪府高槻市高見台 4-1
 【氏名又は名称】 中村 敏一
【代理人】
 【識別番号】 100065215
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 三枝 英二
 【電話番号】 06-203-0941
【選任した代理人】
 【識別番号】 100076510
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 掛樋 悠路
【選任した代理人】
 【識別番号】 100086427
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 小原 健志
【選任した代理人】
 【識別番号】 100090066

【弁理士】

【氏名又は名称】 中川 博司

【選任した代理人】

【識別番号】 100094101

【弁理士】

【氏名又は名称】 館 泰光

【選任した代理人】

【識別番号】 100099988

【弁理士】

【氏名又は名称】 斎藤 健治

【選任した代理人】

【識別番号】 100105821

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤井 淳

【選任した代理人】

【識別番号】 100099911

【弁理士】

【氏名又は名称】 関 仁士

【選任した代理人】

【識別番号】 100108084

【弁理士】

【氏名又は名称】 中野 睦子

【選任した代理人】

【識別番号】 100109438

【弁理士】

【氏名又は名称】 大月 伸介

【選任した代理人】

【識別番号】 100109427

【弁理士】

【氏名又は名称】 鈴木 活人

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 001616

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【物件名】 委任状 1

【書類名】 明細書

【発明の名称】 血管新生抑制剤

【特許請求の範囲】

【請求項1】 以下の（a）又は（b）に記載されるポリペプチドを有効成分として含有する血管新生抑制剤。

（a）HGF（Hepatocyte growth factor）のPyrGlu³²～Val⁴⁷⁸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、

（b）（a）のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつc-Met/HGFレセプターを介するHGFの作用に対してアンタゴニスト活性を有するポリペプチド

【請求項2】 上記ポリペプチドが、少なくとも一つのヘアピンドメイン及び4つのクリングルドメインを有するものである請求項1記載の血管新生抑制剤。

【請求項3】 上記ポリペプチドがHGFをエラスターゼで消化して得られるものである請求項1又は2記載の血管新生抑制剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、血管新生抑制剤に関する。より詳細には、HGF（Hepatocyte growth factor）の α 鎖の特定領域を含む蛋白質を有効成分とする血管新生抑制剤に関する。本発明の血管新生抑制剤は、その血管新生抑制作用に基づいて、血管異常増殖に起因する種々の疾患、例えばリウマチ性関節炎、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、老人黄斑部変性、創傷治癒時の過剰瘢痕形成等の予防又は治療剤として有用である。

【0002】

【従来の技術】

血管新生とは、何らかの刺激に応じて、主に細静脈の血管内皮細胞が反応して新しい血管網を形成する現象である。

【0003】

この現象は、正常な状況下においては、組織の代謝を維持し、生体の機能的恒

常性を保持するために不可欠であり、一般に損傷の治癒過程、胎児における肺の発育、黄体形成の進展形成等で観察される。

【0004】

その一方で、従来から異常な血管新生が炎症性疾患を含む種々の疾患に関係していることが知られている。例えば、増殖性糖尿病、尋常性乾癬、リウマチ性関節炎、糖尿病性網膜症、老人黄斑部変性、創傷治癒時の過剰瘢痕形成等の疾患及び固形腫瘍の転移や再発は、血管、特に末梢毛細血管の異常増殖に起因することが報告されている。

【0005】

このため、これらの疾患に対する予防又は治療剤として、血管新生阻害作用を有する物質を有効成分とする種々の血管新生抑制剤が開発されている。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】

本発明は、新規な血管新生抑制因子を提供することを目的とする。さらに、本発明は種々の疾患の予防及び治療に役立つ血管新生抑制剤を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、上記目的に基づいて新規な血管新生抑制因子を求めて日夜研究を重ねていたところ、HGF (Hepatocyte growth factor) の α 鎖の特定領域を含む蛋白質に血管新生を有意に抑制する作用があることを見いだして本発明を開発するに至った。

【0008】

HGFは、そもそも本発明者によって1984年に肝実質細胞の新規増殖因子として見いだされたポリペプチドである。本発明者のその後の研究によって、HGFは分子量約69 kDaの α 鎖と約34 kDaの β 鎖からなるヘテロダイマーであり、 α 鎖にはN末端ヘアピンドメインと4つのクリングルドメインが、また β 鎖にはセリンプロテアーゼ様ドメインが存在するユニークなドメイン構造を有することがわかった。HGFの発見当初は肝再生因子の本体として肝細胞に特異

性の高い増殖因子であると考えられていたが、1989年以降リコンビナントHGFが使用できるようになってから肝細胞以外にも多くの上皮細胞に対して強力なマイトゲンとして働くことが明らかになった。また、更なる研究によってHGFはかかる細胞増殖制御に加えて、細胞運動 (cell motility) を促進するモーターゲン (motogen) としての機能 (T.Nakamura, Prog.growth Factor Res.,3,67-85, 1991) や、多くの癌細胞の増殖を抑制するtumor suppressor作用などの新しい生物活性を有することがわかった。

【0009】

さらに1991年には、HGFの高親和性で機能的なレセプターが、プロトオンコジーン産物 (c-met産物: c-Met) であることが明らかとなり、本発明者は、 α 鎖内のN末端ヘアピンならびに第1、第2クリングルドメインが該c-Met/HGFレセプターに結合する最小ドメインであることを見いだした。

【0010】

本発明者は更なる研究によって、 α 鎖内のN末端ヘアピンならびに第1から第4の4つのクリングルドメインを有するポリペプチドが、上記レセプター (c-Met/HGFレセプター) を介するHGFの作用に対してアンタゴニスト活性を有しており、さらにかかるポリペプチドが血管新生を有意に抑制する作用を有していることを見いだした。

【0011】

本発明は、このような年余にわたるHGFの研究に基づいてなされたものである。すなわち、本発明は、次に掲げる血管新生抑制剤である。

【0012】

(1) 以下の(a)又は(b)に記載されるポリペプチドを有効成分として含有する血管新生抑制剤。

【0013】

(a) HGF (Hepatocyte growth factor) のPyrGlu³²~Val⁴⁷⁸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、

(b) (a) のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換

若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつ c-Met / HGF レセプターを介する HGF の作用に対してアンタゴニスト活性を有するポリペプチド。

【0014】

(2) 上記ポリペプチドが、少なくとも一つのヘアピンドメイン及び4つのクリングルドメインを有するものである(1)記載の血管新生抑制剤。

【0015】

(3) 上記ポリペプチドが HGF をエラスターゼで消化して得られるものである
(1) 又は (2) 記載の血管新生抑制剤。

【0016】

なお、本明細書において、アミノ酸、ペプチド、塩基配列その他に関する略号による表示は、基本的には IUPAC 及び IUPAC-IUB による命名法又はその規定、及び「塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン」(平成9年3月、特許庁調整課審査基準室)に従うものとする。

【0017】

また、本発明において、アミノ酸番号やアミノ酸の位置は、プレプロ HGF のアミノ酸配列を基準として表記する。

【0018】

本発明で、PyrGlu とは、修飾アミノ酸であるピログルタメート (pyroglutamate) を意味し、PyrGlu³² とは、プレプロ HGF のアミノ酸配列を基準として 32 番目のアミノ酸残基が、ピログルタメートになっていることを示す。

【0019】

【発明の実施の形態】

本発明の血管新生抑制剤は、HGF の α 鎖に起因するものであって血管新生抑制作用を有するポリペプチドを有効成分として含有するものである。

【0020】

ここで「HGF の α 鎖に起因する」とは、HGF の α 鎖の全領域又はその断片を連続的もしくは非連続的に有するという意味で用いられる。

【0021】

血管新生抑制作用とは、血管新生を抑制する作用であればその機序の別を問う

ものではないが

、好適にはHGFが有する血管新生作用に対して抑制的に働く作用を意味する。

【0022】

かかる作用を有するポリペプチドとしては、HGFのレセプターであるc-Met/HGFレセプターに親和性を有し、該レセプターへのHGFの結合を競合的に阻害する作用を有するものを挙げることができる。好適には、c-Met/HGFレセプターに結合して、c-Met/HGFレセプターを介するHGFの作用に対してアンタゴニスト活性を有するポリペプチドである。

【0023】

c-Met/HGFレセプターを介するHGFの作用としては、c-Met/HGFレセプターのチロシンリン酸化作用、モートゲン活性 (motogenic activity)、マイトゲン活性 (mitogenic activity) 及びモルフォゲン活性 (morphogenic activity) を挙げるができる (実験医学, Vol11, No.9 (1993)参照)。

【0024】

従って、本発明で用いられるポリペプチドとしては、これらの作用を抑制・阻害するもの、具体的にはHGF誘導によるc-Met/HGFレセプターのチロシンリン酸化を抑制・阻害する作用、HGFが有するモートゲン活性を抑制・阻害する作用、HGFが有するマイトゲン活性を抑制・阻害する作用、及びHGFが有するモルフォゲン活性を抑制・阻害する作用を有するものが挙げられる。

【0025】

このようなポリペプチドとしては、好適にはHGFのPyrGlu³²~Val⁴⁷⁸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、具体的には配列番号1で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドを挙げるができる。尚、配列番号1中、「Xaa」とは、「PyrGlu」を意味する。

【0026】

当該ポリペプチドは、基本的にはHGFをエラスターゼ処理することによって得られ、HGFの α 鎖のN末端領域の447アミノ酸から構成される。このため、当該ポリペプチドは、HGFの α 鎖と同様にN末端アミノ酸として修飾アミノ酸残基：ピログルタメートを有し、一つのN末端ヘアピンドメインと4つのクリ

ングルドメインを有している。なお、本発明において当該ポリペプチドをHGF／NK4とも称する。

【0027】

後述する実施例で示すように、当該ポリペプチドは、c-Met／HGFレセプターにHGFと競合的に結合するアンタゴニスト活性をもち、HGFが誘導するc-Met／HGFレセプターの自動チロシンリン酸化を抑制・阻害する作用を有している。また当該ポリペプチドは、それ自身はマイトゲン活性、モートゲン活性及びモルフォゲン活性を殆ど有しておらず、HGFが有するマイトゲン活性、モートゲン活性及びモルフォゲン活性を阻害する性質を有している。

【0028】

しかしながら、前述するように本発明の血管新生抑制剤の有効成分として用いられるポリペプチドは、HGFの α 鎖に起因するものであって血管新生抑制作用を有するものであれば、上記配列番号1で示される特定のポリペプチドに限定されることはない。

【0029】

かかるポリペプチドとしては、具体的には、HGFのPyrGlu³²～Val⁴⁷⁸からなるアミノ酸配列の一部若しくは数個乃至は複数のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドであって、かつc-Met／HGFレセプターを介するHGFの作用に対してアンタゴニスト活性を有するポリペプチドを挙げることができる。

【0030】

より好適には前述するHGF／NK4と同じか若しくは同程度の生理活性を有するポリペプチドを挙げることができる。

【0031】

ここでアミノ酸の「欠失、置換若しくは付加」の程度およびそれらの位置等は、改変されたポリペプチドが上記生理活性を有するものであれば特に制限されず、例えば上記HGF／NK4のN末端及び／又はC末端において1若しくは複数（又は数個）のアミノ酸が欠失又は付加したポリペプチド、ヘアピンドメイン及び4つのクリングルドメイン以外の領域において1若しくは複数（又は数個）の

アミノ酸が置換、欠失又は付加したポリペプチド等を例示することができるが、少なくとも一つのヘアピンドメイン及び4つのクリングルドメインを有していることが望ましい。かかるポリペプチドとして、具体的には、HGF/NK4のポリペプチドのうちアミノ酸番号162～166（配列番号1において、アミノ酸番号131～135）の5つのアミノ酸が欠失したポリペプチド（HGF/NK4 (del5)）を挙げることができる（配列番号2）。

【0032】

本発明で用いられるHGF/NK4又はHGF/NK4 (del5)は、配列番号1又は2に示すアミノ酸配列又は既に公知のHGFの遺伝子配列等に基づいて、慣用のペプチド合成に準じて化学的に製造するか又は遺伝子工学的に製造することができるが、好適にはHGFを酵素的に分解することによって得ることができる。

【0033】

HGFの酵素分解は、例えばエラスターゼ等の酵素を用いてHGFを消化することにより行うことができる。次いで、高速液体クロマトグラフィーやSDS-PAGE等の慣用の蛋白精製法を用いて酵素消化物を精製し、所定の分子量を有するポリペプチドを単離することにより、HGF/NK4を取得することができる。ここで分子量としては、SDS-PAGEの還元条件下で約65～69kD、好ましくは約67kDを挙げることができ、またSDS-PAGEの非還元条件下で約48～52kD、好ましくは約50kDの分子量を挙げることができる。

【0034】

なお、酵素分解に用いられるHGFは、その取得の由来及び調製法等によって特に制限されるものではない。

【0035】

例えば、ヒトを含む哺乳動物の肝臓などの組織、血小板や白血球などの血液細胞又は血漿や血清などから抽出、精製することによって得ることができるし（FEBS, 224, 312, (1987) ; Proc. Acad. Sci. USA, 86, 5844, (1989)）、またHGFを産生する初代培養細胞や株化細胞を培養し、培養物から分離、精製することによって

得ることができる。また、遺伝子工学的的手法によりHGFをコードする遺伝子を適切なベクターに組み込み、これを適当な宿主細胞（例えば、動物細胞）に挿入して形質転換し、この形質転換体の培養上清から目的とする組換えHGFを得ることもできる（例えば、Nature, 342, 440, 1989；特開平5-111383号公報；特開平3-255096号公報；Biochem. Biophys. Res. Commun., 163, 967, 1989等）。HGFをコードする遺伝子としては、通常ヒトを含む哺乳動物に由来するHGF遺伝子、好ましくはヒトに由来するHGF遺伝子、より好ましくはヒトに由来する組換えHGF遺伝子（特開平5-111383号公報）を用いることができる。

【0036】

またHGF/NK4のアミノ酸配列に基づいて改変されてなるいわゆる改変体は、ペプチド合成法により化学的に調製してもよく、またHGFの遺伝子に基づいて遺伝子工学的改変法で調製することもできる。

【0037】

遺伝子工学的改変法としては、例えばサイトスペシフィック・ミュータゲネシス [Methods in Enzymology, 154: 350, 367-382 (1987)；同 100: 468 (1983)；Nucleic Acids Res., 12: 9441 (1984)；続生化学実験講座1「遺伝子研究法I」、日本生化学会編, p105 (1986)] 等の遺伝子工学的的手法、リン酸トリエステル法やリン酸アミダイト法等の化学合成手段 [J. Am. Chem. Soc., 89: 4801 (1967)；同91: 3350 (1969)；Science, 150: 178 (1968)；Tetrahedron Lett., 22: 1859 (1981)；同24: 245 (1983)] 及びそれらの組合せ方法等が例示できる。

【0038】

本発明の血管新生抑制剤は、その投与剤形を特に制限するものではなく、例えば散剤、細粒剤、顆粒剤、錠剤、丸剤、カプセル剤、液剤、乳剤、懸濁剤又はシロップ剤等の経口剤；軟膏、クリーム、貼付剤、坐剤等の外用剤；点眼剤、眼軟膏等の眼用剤；注射剤、点滴などの種々の製剤形態をとり得る。これらの投与剤は、この分野で通常知られた慣用的な製剤方法により製剤化される。

【0039】

錠剤の形態に成形するに際しては、担体として例えば乳糖、白糖、塩化ナトリ

ウム、ブドウ糖、尿素、デンプン、炭酸カルシウム、カオリン、結晶セルロース、ケイ酸等の賦形剤、単シロップ、ブドウ糖液、デンプン液、ゼラチン溶液、カルボキシメチルセルロース、セラック、メチルセルロース、リン酸カリウム、ポリビニルピロリドン等の結合剤、乾燥デンプン、アルギン酸ナトリウム、カンテン末、ラミナラン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類、ラウリル硫酸ナトリウム、ステアリン酸モノグリセリド、デンプン、乳糖等の崩壊剤、白糖、ステアリン酸、カカオバター、水素添加油等の崩壊抑制剤、第4級アンモニウム塩基、ラウリル硫酸ナトリウム等の吸収促進剤、グリセリン、デンプン等の保湿剤、デンプン、乳糖、カオリン、ベントナイト、コロイド状ケイ酸等の吸着剤、精製タルク、ステアリン酸塩、ホウ酸末、ポリエチレングリコール等の滑沢剤等を使用できる。更に錠剤は必要に応じて通常の剤皮を施した錠剤、例えば糖衣錠、ゼラチン被包錠、フィルムコーティング錠、二重錠、多層錠等とすることができる。

【0040】

丸剤の形態に成形するに際しては、担体として例えばブドウ糖、乳糖、デンプン、カカオ脂、硬化植物油、カオリン、タルクなどの賦形剤、アラビアゴム末、トラガント末、ゼラチン等の結合剤、ラミナラン、カンテンなどの崩壊剤等を使用できる。

【0041】

カプセル剤は常法に従い、上記ペプチドを上記で例示した各種の担体と混合して硬化ゼラチンカプセル、軟質カプセル等に充填して調製される。

【0042】

坐剤の形態に成形するに際しては、担体として例えばポリエチレングリコール、カカオ脂、高級アルコール、高級アルコールのエステル類、ゼラチン、半合成グリセライド等が使用できる。

【0043】

注射剤は常法に従って調製することができ、例えば上記ポリペプチドを適切な溶媒に溶解した後、フィルター等で濾過して滅菌し、次いで無菌的な容器に充填することによって調製することができる。なお、注射液は血液と等張であるのが

好ましく、これらの形態に成形するに際しては、希釈剤として例えば滅菌水、エチルアルコール、マクロゴール、プロピレングリコール、エトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル類等を使用できる。なお、この場合等張性の溶液を調製するに十分な量の食塩、ブドウ糖あるいはグリセリンを医薬製剤中に含有せしめてもよく、また通常の溶解補助剤、緩衝剤、無痛化剤等を添加してもよい。

【0044】

軟膏剤を調製する場合は、上記ペプチドに通常使用される基剤、安定化剤、潤滑剤、保存剤等が必要に応じて配合され、常法により混合、製剤化される。基剤としては流動パラフィン、白色ワセリン、サラシミツロウ、パラフィン等が挙げられる。保存剤としてはパラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル等が挙げられる。

【0045】

貼付剤を製造する場合には、通常の支持体に前記軟膏、ペースト、クリーム、ゲル等を常法により塗布すればよい。支持体としては綿、スフ、化学繊維からなる織布、不織布や軟質塩化ビニル、ポリエチレン、ポリウレタン等のフィルムあるいは発泡体シートが適当である。

【0046】

更に上記各製剤には、必要に応じて着色剤、保存剤、香料、風味剤、甘味剤等の薬学的に許容される添加剤や他の医薬品を含有させてもよい。

【0047】

製剤化に際しては、安定化剤を配合することが好ましい。安定化剤としては例えば、アルブミン、グロブリン、ゼラチン、マンニトール、グルコース、デキストラン、エチレングリコール等を挙げることができる。

【0048】

また、注射剤等の液剤とする場合は、凍結保存するか、または予め凍結乾燥品として調製することが好ましい。凍結乾燥品は、用時に注射用蒸留水等により再溶解して使用される。

【0049】

本発明の製剤中に含有されるべきポリペプチドの量としては、特に限定されず広範囲に適宜選択されるが、通常製剤中0.0002~0.2 (w/v%)程度、好ましくは0.001~0.1 (w/v%)程度とするのがよい。

【0050】

上記医薬製剤の投与方法は特に制限はなく、各種製剤形態、患者の年齢、性別、その他の条件、疾患の程度等に応じて適宜決定される。例えば、注射剤は単独であるいはブドウ糖、アミノ酸等の通常の補液と混合して静脈内投与され、更に必要に応じて単独で筋肉内、皮内、皮下もしくは腹腔内投与される。

【0051】

本発明の血管新生抑制剤の1日当りの投与量は、患者の症状、体重、年齢、性別等によって異なり一概に決定できないが、通常成人1日当り約0.01~100mgとすればよく、これを1回又は数回に分けて投与するのが好ましい。

【0052】

本発明の血管新生抑制剤は、血管新生が関与する疾患の予防又は治療に広く適用することができる。かかる疾患としては、特に制限はないが、具体的には、例えばリウマチ性関節炎、乾癬、オスラー-ウェバー (Osler-Webber) 症候群、心筋の脈管形成、末梢血管拡張症、血友病性関節症、眼の脈管形成性疾患（例えば、糖尿病性網膜症、未熟児網膜症、老人黄斑部変性、角膜移植拒絶、血管新生緑内障、水晶体後線維増殖症又はルペオーシス等）、血管線維腫、良性腫瘍（例えば、血管種、聴神経腫、神経線維種、トラコーマ、化膿性肉芽腫等）、白血病を含む造血器腫瘍、固形腫瘍、腫瘍転移、創傷肉芽形成等を挙げることができる。

【0053】

本発明の血管新生抑制剤は、また内皮細胞の過度若しくは異常な刺激によって生じる疾患の予防又は治療に広く適用することができる。かかる疾患としては、特に制限はないが、具体的には、例えば腸管癒着、クローン病、アテローム硬化症、強皮症、例えばケロイド等の過剰癒痕形成等を挙げることができる。

【0054】

本発明の血管新生抑制剤は、さらに胚着床に必要な血管新生を妨げることに基

づく受胎調節剤として有用であり、また病的な結果としてネコのひっかき疾患 (cat scratch disease) や潰瘍といった脈管形成を伴う疾患の予防剤又は治療剤として有用である。

【0055】

【実施例】

以下、本発明を更に詳しく説明するため、参考例及び実施例を挙げるが、これらは本発明の一例であり、かかる例示によって本発明は何ら制限を受けるものではない。

【0056】

実施例 1 HGF/NK4 の単離精製

ヒト HGF cDNA で形質転換した CHO 細胞を培養して、該培養物からヒト遺伝子組換え HGF を精製単離した (Nature 342, 440-443 (1989); Biochem. Biophys. Res. Commun. 172, 321-327 (1990))。次いで該組換え HGF (900 mg) を 0.2 M トリス/塩酸緩衝液 (pH 8.8) 中で 37℃、20 分間、胰臓エラスターゼ (Sigma 社製) (酵素: 基質 = 1:100) で消化し、該消化物を逆相高速液体クロマトグラフィー (HPLC: μ Bondapak C4 カラム使用、日本ウォータース社製) に付して、0.05% トリフルオロ酢酸を含有するアセトニトリルのグラジエントによって溶出し、精製した。図 1A に示すように、HPLC により 3 つのピークが得られた。

【0057】

次いで、これらの各ピーク画分を SAS-PAGE にかけて、タンパク染色した (図 1B)。それにより、第一のピークが非還元条件下で 50 kD、還元条件下で 67 kD の分子量を有するフラグメントであり、第二のピークが 69 kD の α 鎖及び 34/32 kD の β 鎖からなる未消化のヘテロダイマー HGF に相当し、第三のピークが非還元条件下で 33/31 kD、及び還元条件下で 34/32 kD 分子量を有するフラグメントであることがわかった。このことは、HGF をエラスターゼ処理することによって、 α 鎖の大部分を有するがそれよりもわずかに小さいフラグメント (第一ピーク) と、 α 鎖の C 末端側の一部と完全な β 鎖とからなるフラグメント (第三ピーク) との 2 つに消化されることが分かった。

【0058】

精製フラグメントについてアミノ酸配列を分析するために、まず各溶出画分から溶媒を蒸発して、残渣を0.05%CHAPS (Sigma社製) 及び1M NaClを含む0.1M リン酸緩衝型 (pH7.3) に溶解した。アミノ酸分析は、自動プロテインシーケンサー モデル492 (Applied Biosystem Inc.社製) を用いて行った。

【0059】

まず第一ピークのフラグメントのN末端アミノ酸分析を行ったが、うまくいかなかったため、HGFのN末端と同様にN末端がピログルタメートになっている可能性が示唆された。そこで、該フラグメントをピログルタメートアミノペプチダーゼで処理してN末端アミノ酸分析を行ったところ、その配列はRKRRNTIHEFであり、 α 鎖の2~11番目のN末端アミノ酸配列と一致した。このことから、該フラグメントのN末端アミノ酸はピログルタメートに修飾されたグルタミンであり、N末端領域の構造は未消化のHGFと同じであることが判明した。

【0060】

次に、当該フラグメントのC末端を分析するために、エラスターゼ消化によって生じた他のフラグメント (第三ピーク) について、それが有する部分 α 鎖のN末端をアミノ酸分析した。その結果、該部分 α 鎖のN末端領域のアミノ酸配列はHGFのAsn⁴⁷⁹-Ala⁴⁸⁸に相当することがわかった。これから、第一ピークフラグメントのC末端はVal⁴⁷⁸であることが判明した。

【0061】

以上の結果から、HGFをエラスターゼ処理することによって、2つのフラグメントに消化され、その一つはHGFのヘアピンドメインと4つのクリングルドメインを有するPyrGlu³²~Val⁴⁷⁸の領域からなるフラグメント (HGF/NK4) であり、他の一つは α 鎖の一部 (Asn⁴⁷⁹から始まる16アミノ酸) と β 鎖とからなるフラグメントであることが明らかになった (図2)。

【0062】

実施例2 HGF/NK4の細胞表面レセプターとの結合性

実施例1で調製したHGF/NK4について、細胞表面レセプターとの結合性

を調べた。また比較実験として、HGFを用いて同様に細胞表面レセプターとの結合性を調べた。なお、HGF/NK4及びHGFはクロラミン-T法によって放射性標識し (^{125}I -HGF/NK4、 ^{125}I -HGF)、また細胞表面レセプター標品としてラット肝臓から調製した原形質膜を用いた。

【0063】

スキャッチャード分析により、HGF及びHGF/NK4はいずれも80 pMまで、濃度依存的に細胞表面レセプターと結合することがわかり (図3A及びB)、HGFレセプターのK_d及び数は64.5 pM及び5478部位/ngであり、HGF/NK4レセプターのK_d及び数は486 pM及び6427部位/ngであった。

【0064】

HGF/NK4がHGFに対する競合的なアンタゴニストであるか否かを調べるために、肝臓の原形質膜 (50 μg) を ^{125}I -HGF単独 (60 pM)、または ^{125}I -HGFに種々の濃度の非標識HGF若しくはHGF/NK4を加えて、それらの存在下でインキュベーションした。 ^{125}I -HGFの膜結合は、非標識HGFの添加によって完全に阻害され、HGFによる50%阻害濃度は60 pMであった。HGF/NK4もまた同様に ^{125}I -HGFの膜結合を阻害し、HGF/NK4による50%阻害濃度は600 pMであり、60 nMで完全に ^{125}I -HGFの膜結合を阻害した (図3C)。

【0065】

このことから、HGF/NK4は、c-Met/HGFレセプターに対して、HGFより8~10倍低いものの親和性を有しており、HGFのアンタゴニストであることが示唆された。

【0066】

実施例3 HGF/NK4のミトゲン活性及びHGFのミトゲン活性に対する阻害作用

ラット初代培養肝細胞のDNA合成を測定することにより、HGF/NK4のミトゲン活性を調べた。また、比較対象実験として、同様にHGFのミトゲン活性を測定した (Nature 342,440-443 (1989); Biochem.Biophys.Res.Comm.

181,691-699 (1991))。

【0067】

結果を図4Aに示す。該図から分かるように、HGFは用量依存的に肝細胞のDNA合成を促進するのに対して、HGF/NK4は100nMという高濃度でも促進効果はなかった。

【0068】

一方、HGFを含有する培養液中にHGF/NK4を入れ、HGFとHGF/NK4を共存させた場合、HGF/NK4は用量依存的にHGFによって促進されるDNA合成を抑制し、60nMでほぼ完全に阻害した(図4B)。それに対して、HGF/NK4は表皮成長因子(EGF)によって促進されるDNA合成に対しては阻害作用を示さなかった(図4B)。

【0069】

これらのことから、HGF/NK4は、それ自身マイトゲン活性を有しないが、HGFのマイトゲン活性を特異的に阻害する作用を有していることがわかる。

【0070】

実施例4 HGF/NK4のモートゲン活性及びHGFのモートゲン活性に対する阻害作用

腎尿細管由来の正常上皮細胞であるMDCK細胞を用いてHGF/NK4のモートゲン活性を調べた。

【0071】

MDCK細胞は、HGFを含まないコントロール培地中では隙間なくコロニーを形成したが、HGF(22pM)を培地に添加するとMDCK細胞の運動性を亢進し、該細胞を分散させた。それに対してHGF/NK4は細胞を全く分散させず、細胞と細胞の接触性はよく維持されていた。また、MDCK細胞をHGF及びHGF/NK4の共存下で培養したところ、HGF/NK4はHGFによって誘導される細胞分散を阻害した。

【0072】

これらのことから、HGF/NK4は、それ自身モートゲン活性を有しないが、HGFのモートゲン活性を阻害する作用を有していることがわかる。

【0073】

実施例 5 HGF/NK4 のモルフォゲン活性及びHGF のモルフォゲン活性に対する阻害作用

HGF/NK4 が、HGF の有するモルフォゲン活性を阻害するか否かを調べるために、腎尿細管由来の正常上皮細胞であるMDCK細胞をHGF及び／又はHGF/NK4 の存在下、コラーゲンゲル中で生育させた。

【0074】

MDCK細胞は、HGF を含まないコントロール培地中では球状の細胞塊を形成したが、HGF (55 pM) を培地に添加すると枝分かれした管腔構造が誘導された。それに対してHGF/NK4 (55 nM) を添加しても管腔構造は誘導されなかった。また、MDCK細胞をHGF及びHGF/NK4 の共存下で培養すると、細胞は細胞塊の状態を維持し、管腔構造は誘導されなかった。

【0075】

これらのことから、HGF/NK4 は、それ自身モルフォゲン活性を有しないが、HGF のモルフォゲン活性を阻害する作用を有していることがわかる。

【0076】

実施例 6 HGF/NK4 のHGF が誘導する c-Met チロシンリン酸化の阻害作用

肺癌細胞A549は、c-Met/HGFレセプターを発現しており、HGF 刺激によってc-Met のチロシンリン酸化が亢進することが知られている。そこで、HGF/NK4 が該HGF のc-Met に対するチロシンリン酸化作用を阻害するかどうかを調べた。

【0077】

具体的には、A549細胞をHGF及び／又はHGF/NK4 で刺激して、細胞を可溶化させて、抗c-Met 抗体で免疫沈降させ、ウエスタンブロッティングを行って、抗ホスチロシン抗体でc-Met のチロシンリン酸化を観察した。

【0078】

その結果、HGF (110 pM) による刺激によってc-Met のチロシンリン

酸化が誘導されたのに対して、HGF/NK4 (110 nM) による刺激では殆どリン酸化されなかった。また、HGF/NK4 は、HGF 誘導による c-Met のチロシンリン酸化を用量依存的に阻害した。

【0079】

これらのことから、HGF/NK4 は、HGF が誘導する c-Met/HGF レセプターのチロシンリン酸化を抑制することが分かる。また、この阻害作用に基づいて HGF/NK4 は HGF の生物学上の活性に対してアンタゴニストとして作用すると考えられた。

【0080】

実施例 7 HGF/NK4 の血管内皮細胞の増殖抑制作用

血管内皮細胞として、ヒト肺微小血管内皮細胞 (HMVEC-L: Clonetics 社)、ヒト皮膚微小血管内皮細胞 (HMVEC-D: Clonetics 社) を用いて、HGF/NK4 の増殖抑制作用をみた。

【0081】

具体的には、Passage-5~8 の対数増殖期のヒト肺微小血管内皮細胞またはヒト皮膚微小血管内皮細胞の細胞浮遊液を作成し、ゼラチンコートした 24 ウェルのプレートディッシュに 1 ウェルあたり 8000 個の細胞を播きこんだ。24 時間後、新しい培養液 (EGM と DMEM とを 1:1 で混合し、それに 5% となるように血清を混合したもの) に交換し、bFGF、HGF、VEGF および何も添加しないものの 4 つの群を設定し、それに HGF/NK4 を添加して 37℃、5%CO₂ で培養した。72 時間後、トリプシンで細胞を剥がし、Coulter counter で細胞数を計測した。

【0082】

ヒト肺微小血管内皮細胞についての結果を図 5 に、ヒト皮膚微小血管内皮細胞についての結果を図 6 に示す。

【0083】

図から分かるように、HGF/NK4 は 5% 血清、bFGF、HGF、VEGF の刺激により促進された血管内皮細胞の増殖を著明に抑制した。このことから、HGF/NK4 は、HGF アンタゴニストの作用とは異なる新規的作用によっ

て血管内皮細胞の増殖を抑制することが示唆された。

【0084】

実施例 8 HGF/NK4 の鶏胚漿尿膜 (CAM) の血管新生抑制作用

鶏受精卵を 4 日間培養し、気室上部と鶏卵側部の 2 カ所の卵殻に穴をあけ、側部の穴から 3 ml 卵白を吸引し、テープでシールした。気室上部の卵殻と卵殻膜を除去した、胚漿尿膜 (CAM) 上にシリコンリングの中心をあわせるように置き、シリコンリング内に HGF/NK4 または牛血清アルブミン (コントロール) を含むメチルセルロースディスクを置いた。37℃で 2 日間培養した後、CAM 上の血管網を実体顕微鏡下で観察した。結果を表 1 に示す。

【0085】

【表 1】

新生血管の進入度	
HGF/NK4	+
コントロール	+++

【0086】

なおディスク中への新生血管の進入度は次の基準に基づいて評価した

- : 新生血管の進入が認められない
- + : 1～2 程度の新生血管の進入が認められる
- ++ : 3～4 程度の新生血管の進入が認められる
- +++ : 5 以上の新生血管の進入が認められる

また、実体顕微鏡で観察した結果を図面に代わる白黒写真 (図 7) 及び参考写真 1 (カラー) として提出する。

【0087】

これらからわかるように、コントロールのディスクでは、新生血管の進入を著しく認めたのに対して、HGF/NK4 のディスクでは新生血管の進入が殆どなかった。このことから、HGF/NK4 に血管新生抑制作用があることが認められた。

【0088】

実施例9 HGF/NK4による腫瘍血管新生の抑制作用

6～8週齢のヌードマウス（BALB/c nu/nu）背部皮下に 5×10^6 個のGB-d1ヒト胆のう癌細胞を移植した。7日後、HGF/NK4またはコントロールとして生理食塩水を含む浸透圧ポンプ（Alzet社製）を背部皮下に埋め、13日間HGF/NK4または生理食塩水を持続的に移植癌近傍に注入した。癌移植4週間後、癌を摘出し、固定後通常の組織切片を作成した。腫瘍内の血管新生を調べるため、微小血管を抗von Willebrand factor抗体（Dako社）を用いた免疫組織化学法により染色した。結果を表2に示す。

【0089】

【表2】

	<u>von Willebrand factor陽性度</u>
HGF/NK4	+
コントロール	++++

【0090】

なお腫瘍内の血管新生度は次の基準に基づいて評価した

－：von Willebrand factor陽性を示す微小血管が認められない

＋：1/4程度の微小血管がvon Willebrand factor陽性を示す

++：1/2程度の微小血管がvon Willebrand factor陽性を示す

+++：3/4程度の微小血管がvon Willebrand factor陽性を示す

++++：3/4以上の微小血管がvon Willebrand factor陽性を示す

また、顕微鏡で観察した結果を図面に代わる白黒写真（図8）及び参考写真2（カラー）として提示する。

【0091】

これらの結果からわかるように、生理食塩水を注入したコントロールの移植癌組織内にはvon Willebrand factor陽性の微小血管が多数形成され、腫瘍組織内の癌細胞のアポトーシスは認められなかった。これに対して、HGF/NK4を注入した移植癌組織では腫瘍血管新生は著しく抑制され、癌中心部では癌細胞

のアポトーシスが広範囲に認められた。このことから、HGF/NK4はin vivoで腫瘍血管新生を抑制することが判明した。

【0092】

参考例1 HGF/NK4による癌の成長・転移抑制効果-1

6～8週齢のヌードマウス(BALB/c nu/nu)背部皮下に 5×10^6 個のLewis肺癌細胞を移植した。5日後、HGF/NK4又は生理食塩水(コントロール)を含む浸透圧ポンプ(Alzet社製)を背部皮下に埋め、2週間HGF/NK4又は生理食塩水を持続的に移植癌近傍に注入した。癌移植後28日後に移植癌の重量及び肺転移を調べた。癌の体積は(短径)²×(長径)²×0.5で算出した。

【0093】

移植癌の体積を経時的に追跡した結果を図9Aに、図9Bに移植癌の28日目の重量を示す。図からわかるように、生理食塩水を注入したコントロールの移植癌は移植後10日以降急速に成長したが、HGF/NK4は癌の成長を用量依存的に強く抑制した。

【0094】

また、Lewis肺癌の肺転移に関しては、コントロールの生理食塩水注入群では多数の肺転移巣が観察されたのに対して、HGF/NK4を注入した個体では肺転移は用量依存的に強く阻害された(図10、参考写真3)。

【0095】

これらのことから、HGF/NK4は、in vivoで肺癌の成長及び転移を有意に抑制する作用を有していることがわかる。

【0096】

参考例2 HGF/NK4による癌の成長・転移抑制効果-2

6～8週齢のヌードマウス(BALB/c nu/nu)背部皮下に 5×10^6 個のJyg乳癌細胞を移植した。5日後、HGF/NK4又は生理食塩水(コントロール)を含む浸透圧ポンプ(Alzet社製)を背部皮下に埋め、2週間HGF/NK4又は生理食塩水を持続的に移植癌近傍に注入した。移植癌の体積を経時的に測定し、癌移植後28日目に肺表面の転移性腫瘍の数を計測した。

【0097】

移植癌の体積を経時的に追跡した結果を図11Aに、図11Bに癌移植後28日目に肺表面の転移性腫瘍の数を示す。図からわかるように、生理食塩水を注入したコントロールの移植癌は移植後10日以降急速に成長したが、HGF/NK4は癌の成長を抑制した。また、肺転移に関しては、コントロールの生理食塩水注入群では多数の肺転移巣が観察されたのに対して、HGF/NK4を注入した個体では肺転移の抑制が認められた。

【0098】

これらのことから、HGF/NK4は、*in vivo*でjyg乳癌の成長及び転移を有意に抑制する作用を有していることがわかる。

【0099】

製剤例1

生理食塩水100ml中に実施例1で調製したHGF/NK4(1mg)、マンニトール(1g)及びポリソルベート80(10mg)を含有する溶液を無菌的に調製し、1mlずつバイアルに分注した後、凍結乾燥して密封して、本発明の血管新生抑制剤を凍結乾燥製剤として調製した。

【0100】

製剤例2

0.02Mリン酸緩衝液(0.15M NaCl及び0.01%ポリソルベート80含有、pH7.4)100ml中に、実施例1で調製したHGF/NK4 1mg及びヒト血清アルブミン100mgを含む水溶液を無菌的に配合して、1mlずつバイアルに分注した。次いで、各バイアル中の液剤を凍結乾燥して密封して、本発明の血管新生抑制剤を凍結乾燥製剤として調製した。

【0101】

製剤例3

注射用蒸留水100ml中に、実施例1で調製したHGF/NK4(1mg)、ソルビトール(2g)、グリシン(2g)及びポリソルベート80(10mg)を含む溶液を無菌的に調製し、1mlずつバイアルに分注した後、凍結乾燥して密封して、本発明の血管新生抑制剤を凍結乾燥製剤として調製した。

【0102】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：447

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列

Xaa	Arg	Lys	Arg	Arg	Asn	Thr	Ile	His	Glu	Phe	Lys	Lys	Ser	Ala	Lys
1				5					10					15	
Thr	Thr	Leu	Ile	Lys	Ile	Asp	Pro	Ala	Leu	Lys	Ile	Lys	Thr	Lys	Lys
			20					25					30		
Val	Asn	Thr	Ala	Asp	Gln	Cys	Ala	Asn	Arg	Cys	Thr	Arg	Asn	Lys	Gly
		35					40					45			
Leu	Pro	Phe	Thr	Cys	Lys	Ala	Phe	Val	Phe	Asp	Lys	Ala	Arg	Lys	Gln
	50					55					60				
Cys	Leu	Trp	Phe	Pro	Phe	Asn	Ser	Met	Ser	Ser	Gly	Val	Lys	Lys	Glu
65				70					75					80	
Phe	Gly	His	Glu	Phe	Asp	Leu	Tyr	Glu	Asn	Lys	Asp	Tyr	Ile	Arg	Asn
			85					90					95		
Cys	Ile	Ile	Gly	Lys	Gly	Arg	Ser	Tyr	Lys	Gly	Thr	Val	Ser	Ile	Thr
		100						105					110		
Lys	Ser	Gly	Ile	Lys	Cys	Gln	Pro	Trp	Ser	Ser	Met	Ile	Pro	His	Glu
		115				120					125				
His	Ser	Phe	Leu	Pro	Ser	Ser	Tyr	Arg	Gly	Lys	Asp	Leu	Gln	Glu	Asn
	130					135					140				
Tyr	Cys	Arg	Asn	Pro	Arg	Gly	Glu	Glu	Gly	Gly	Pro	Trp	Cys	Phe	Thr
145				150					155					160	
Ser	Asn	Pro	Glu	Val	Arg	Tyr	Glu	Val	Cys	Asp	Ile	Pro	Gln	Cys	Ser

165	170	175
Glu Val Glu Cys Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met		
180	185	190
Asp His Thr Glu Ser Gly Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr		
195	200	205
Pro His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe		
210	215	220
Asp Asp Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys		
225	230	235
Tyr Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr		
245	250	255
Cys Ala Asp Asn Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu Thr Thr		
260	265	270
Glu Cys Ile Gln Gly Gln Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr		
275	280	285
Ile Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His		
290	295	300
Glu His Asp Met Thr Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu		
305	310	315
Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr		
325	330	335
Thr Asp Pro Asn Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys		
340	345	350
Asp Met Ser His Gly Gln Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr		
355	360	365
Met Gly Asn Leu Ser Gln Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp		
370	375	380
Asp Lys Asn Met Glu Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp		
385	390	395
		400

Ala Ser Lys Leu Asn Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala

405

410

415

His Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr

420

425

430

Cys Pro Ile Ser Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val

435

440

445

配列番号 : 2

配列の長さ : 442

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

配列

Xaa Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys

1

5

10

15

Thr Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys

20

25

30

Val Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly

35

40

45

Leu Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln

50

55

60

Cys Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu

65

70

75

80

Phe Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn

85

90

95

Cys Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr

100

105

110

Lys Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His Glu

115

120

125

His Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro

130	135	140	
Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser Asn Pro Glu Val			
145	150	155	160
Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu Cys Met			
	165	170	175
Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp His Thr Glu Ser			
	180	185	190
Gly Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro His Arg His Lys			
	195	200	205
Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe Asp Asp Asn Tyr Cys			
	210	215	220
Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys Tyr Thr Leu Asp Pro			
225	230	235	240
His Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr Cys Ala Asp Asn Thr			
	245	250	255
Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu Thr Thr Glu Cys Ile Gln Gly			
	260	265	270
Gln Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile Trp Asn Gly Ile			
	275	280	285
Pro Cys Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His Glu His Asp Met Thr			
	290	295	300
Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn Tyr Cys Arg Asn			
305	310	315	320
Pro Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn Ile			
	325	330	335
Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys Asp Met Ser His Gly			
	340	345	350
Gln Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met Gly Asn Leu Ser			
	355	360	365

Gln Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met Glu
 370 375 380
 Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala Ser Lys Leu Asn
 385 390 395 400
 Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Asp Ala His Gly Pro Trp Cys
 405 410 415
 Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Tyr Cys Pro Ile Ser Arg
 420 425 430
 Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val
 435 440

【図面の簡単な説明】

【図1】Aは、HGFのエラスターゼ処理物を逆相HPLC（C4）にかけたクロマトグラムであり、Bは逆相HPLCの各ピーク画分を電気泳動（還元条件、非還元条件）に付した結果を示す図である。

【図2】アミノ酸分析によって決定したHGF/NK4の構造を模式的に示す図である。

【図3】A及びBは、それぞれラット肝臓の原形質膜に対する¹²⁵I-HGF（図2A）及び¹²⁵I-HGF/NK4（図2B）の用量依存的な結合を示す図である。Cは、ラット肝臓原形質膜に対する¹²⁵I-HGF結合の非標識HGF又はHGF/NK4による置換曲線を示す図である。なお、図A及びB中に挿入図は、各結合についてのスキッチャードプロットを示す。

【図4】HGFのミトゲン活性に対するHGF/NK4のアンタゴニスト作用を示す図である。ミトゲン活性はラット初代培養肝細胞のDNA合成を測定することによって調べた。図Aは、HGF、HGF/NK4の存在下での肝細胞のDNA合成を示し、Bは60 pMのHGF又は1.5 nMのEGFの存在下での肝細胞のDNA合成に対するHGF/NK4の影響を見た図である。

【図5】bFGF、HGF若しくはVEGFの存在下又は非存在下におけるHGF/NK4によるヒト肺微小血管内皮細胞の増殖抑制作用を調べた図である。

【図6】bFGF、HGF若しくはVEGFの存在下又は非存在下におけるHG

F/NK4によるヒト皮膚微小血管内皮細胞の増殖抑制作用を調べた図である。

【図7】HGF/NK4による鶏胚漿尿膜の血管新生抑制作用を実体顕微鏡による観察により調べた結果を示す、図面にかわる写真である。

【図8】HGF/NK4による腫瘍血管新生抑制作用を免疫組織化学法によって調べた結果を示す、図面にかわる写真である。

【図9】HGF/NK4がLewis肺癌細胞の成長を抑制する作用を有することを示す図面である。Aは移植癌の体積を経時的に追跡した図であり、Bは移植癌の28日目の重量を示す図である。

【図10】HGF/NK4がLewis肺癌細胞の転移を抑制する作用を有することを示す図面である。なお、参考写真3として、コントロール群は明らかに複数の肺転移巣があるのに対して、HGF/NK4投与群は肺転移巣がほとんどないことを示す写真を提示する。

【図11】HGF/NK4がJyg乳癌細胞の成長(A)及び転移(B)を抑制する作用を有することを示す図面である。Aは移植癌の体積を経時的に追跡した図であり、Bは転移巣の数を示す図である。

【参考写真1】図7のカラー写真である。

【参考写真2】図8のカラー写真である。

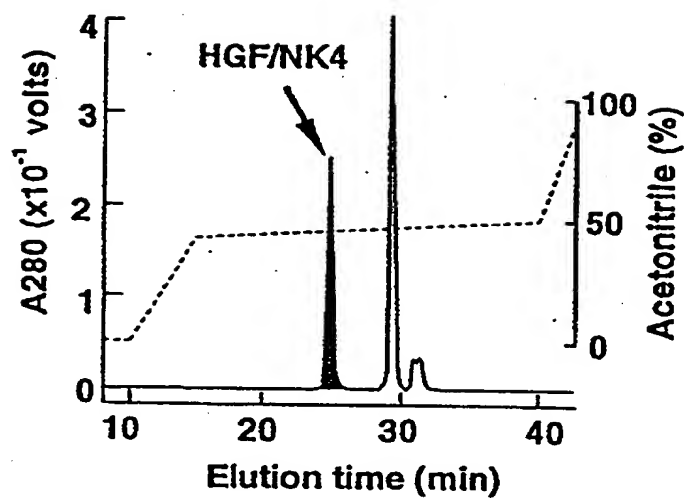
【参考写真3】参考例1において、肺転移巣をコントロール群とHGF/NK4投与群とを比較したカラー写真である。

【書類名】

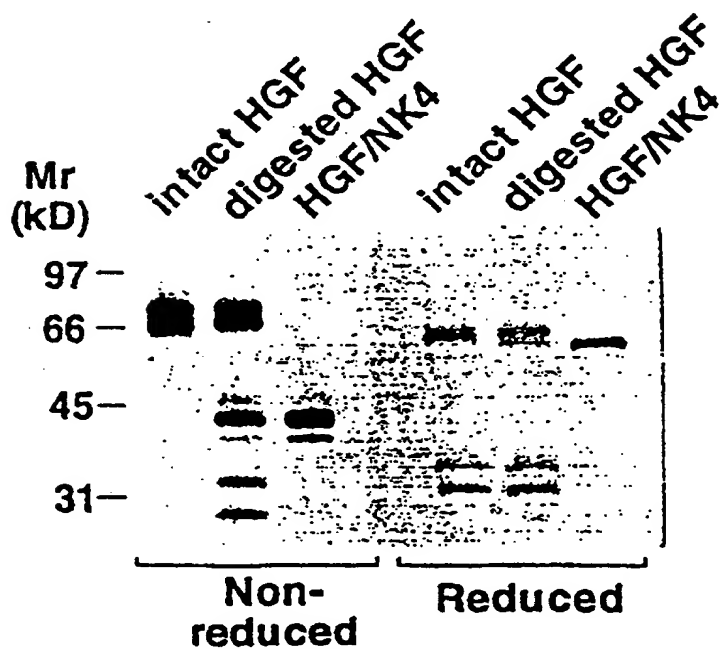
図面

【図 1】

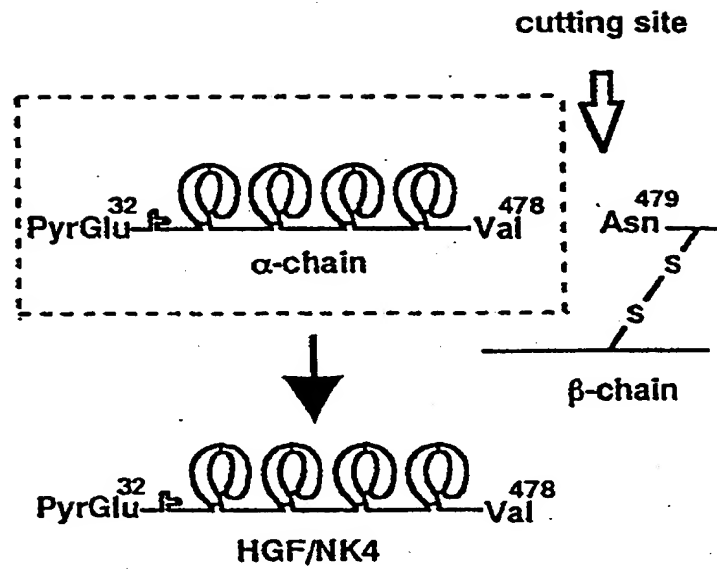
A



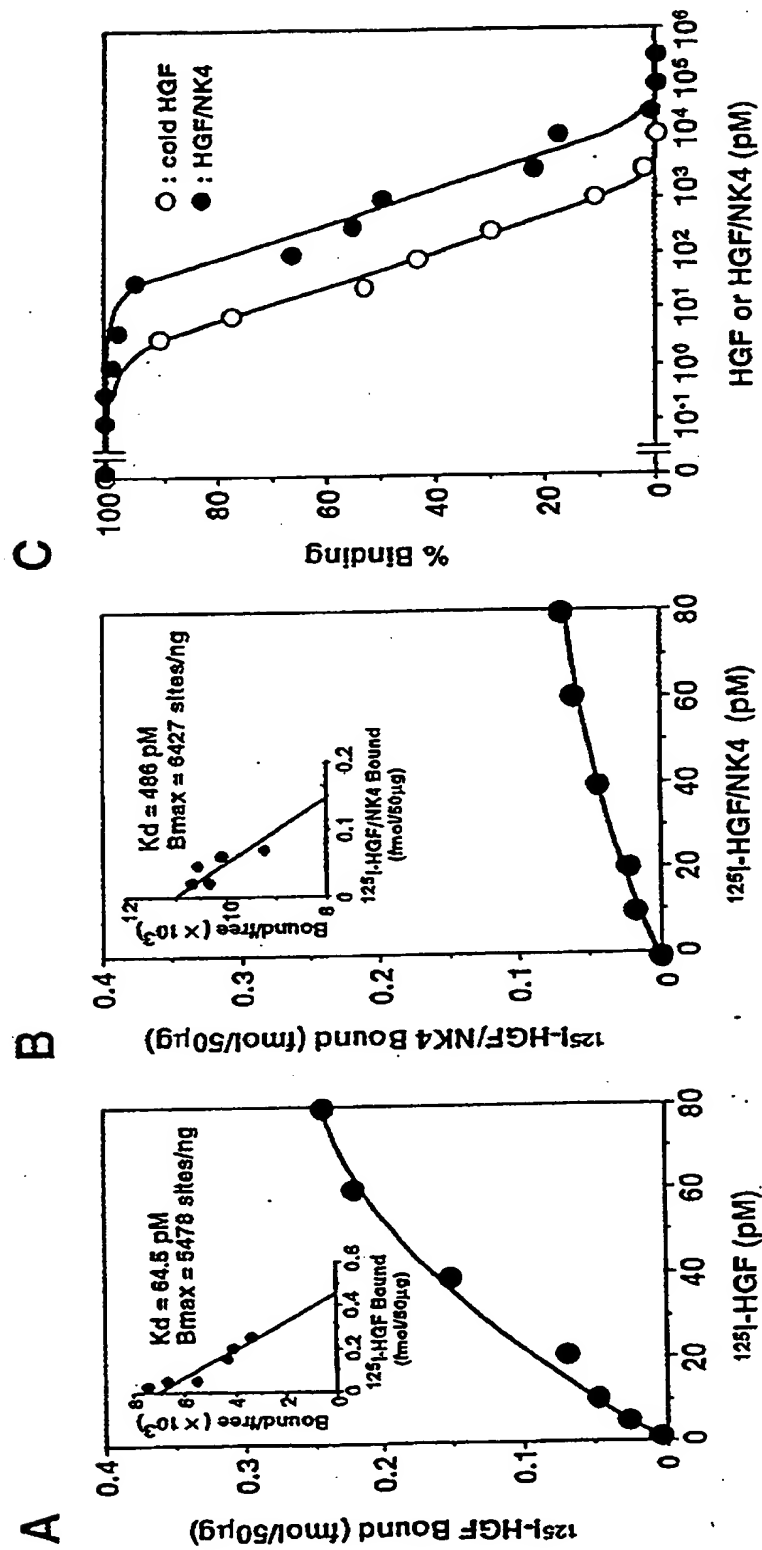
B



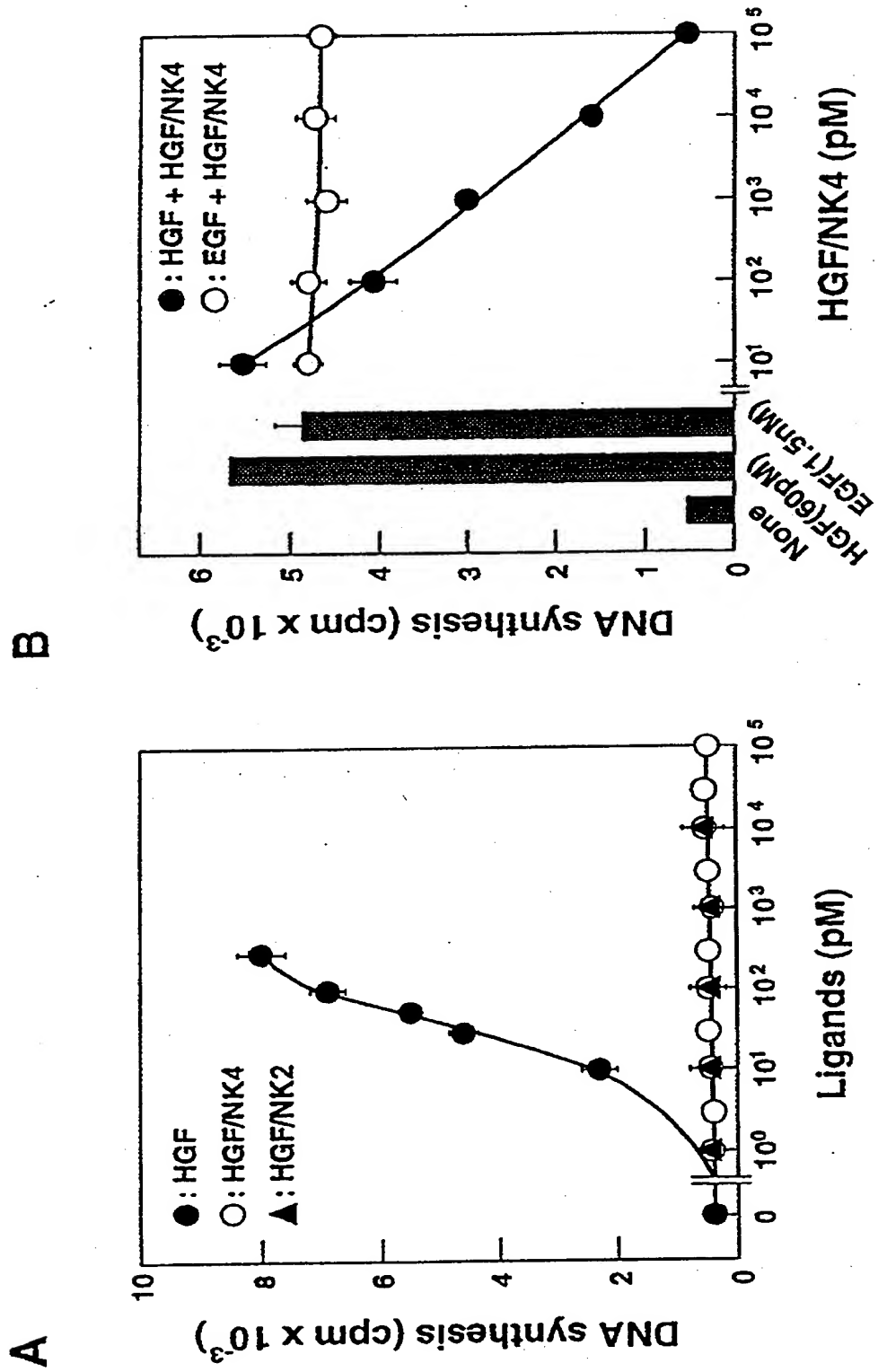
【図 2】



【图 3】

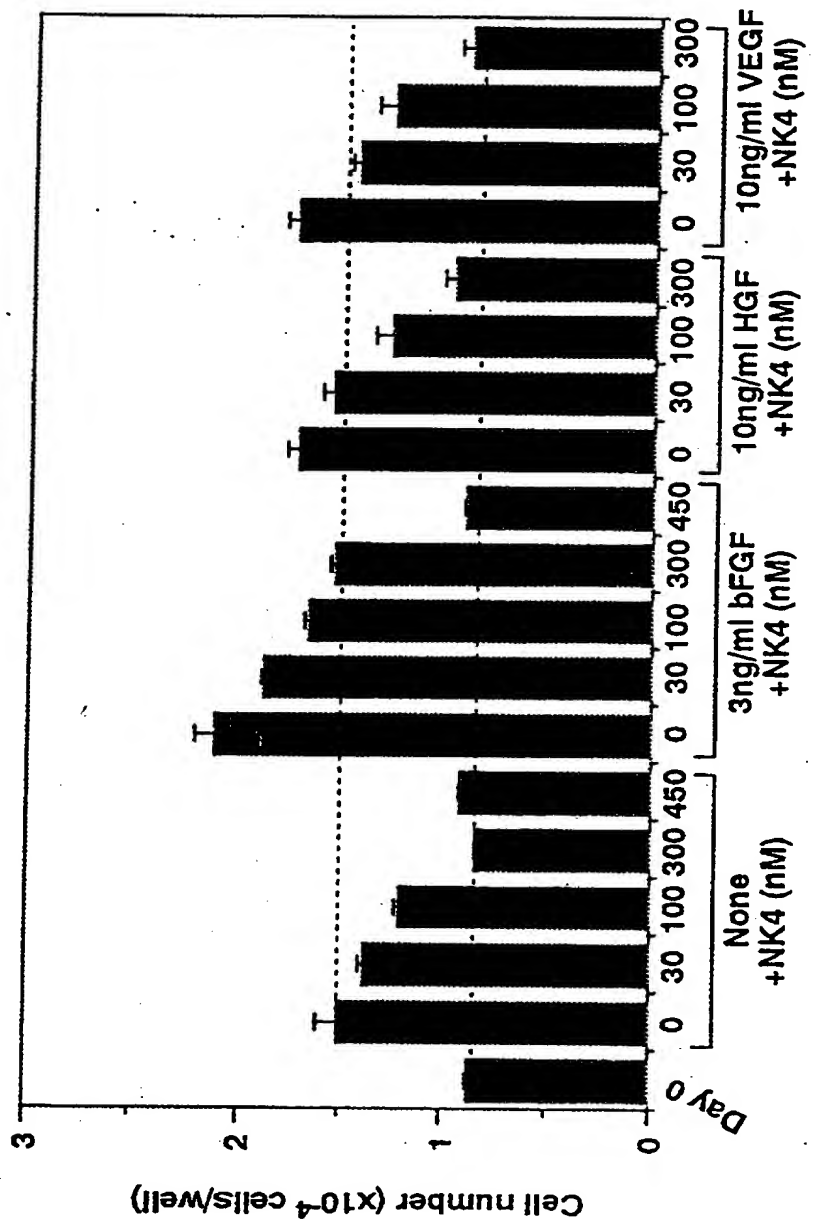


【図 4】



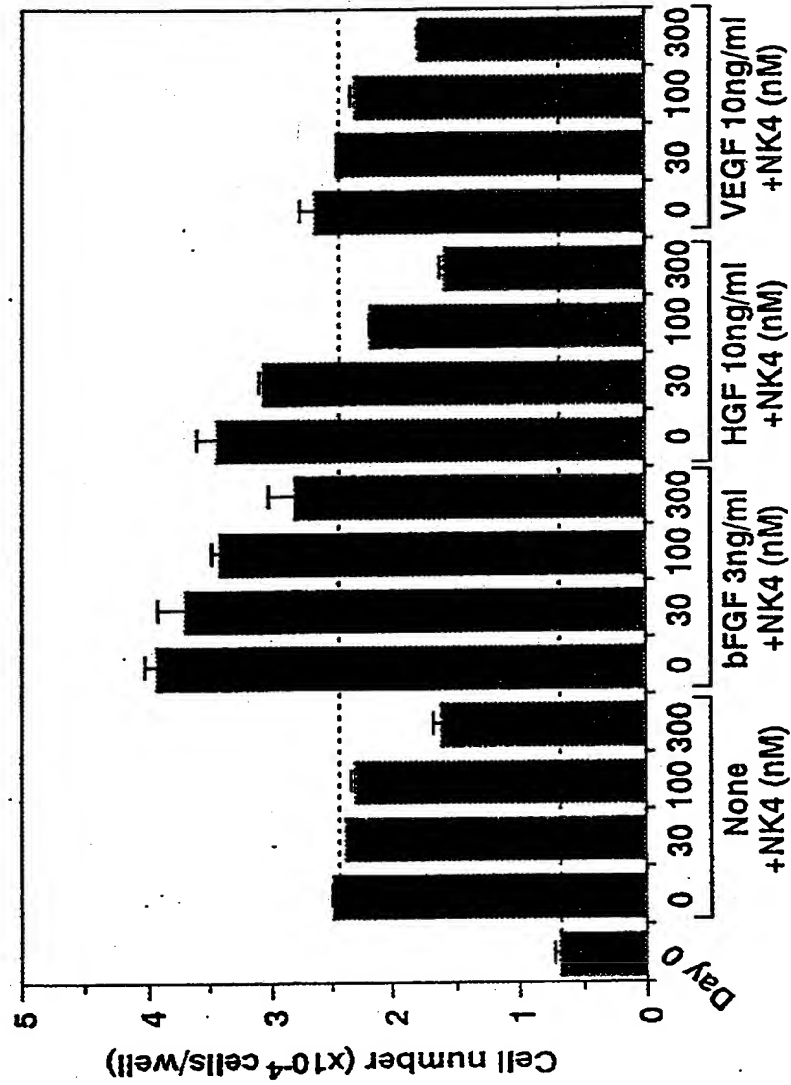
【図 5】

INHIBITORY EFFECT OF HGF/NK4 ON GROWTH OF HUMAN
LUNG MICROVASCULAR ENDOTHELIAL CELLS



【図 6】

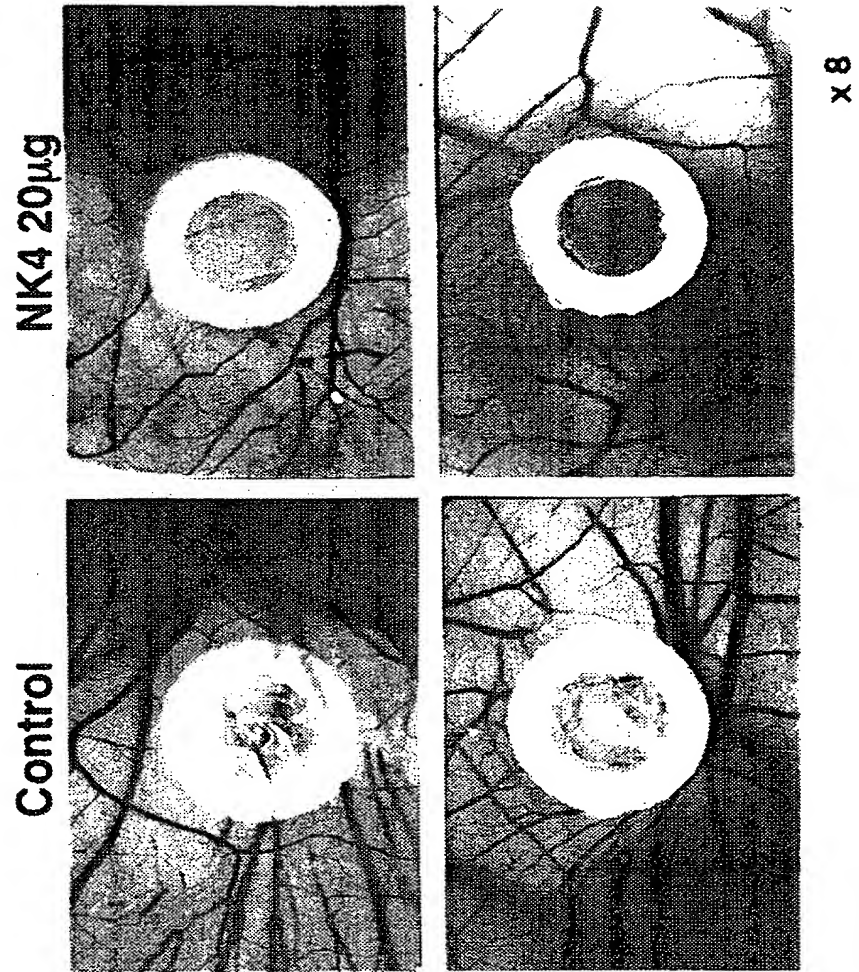
INHIBITORY EFFECT OF HGF/NK4 ON GROWTH OF HUMAN
DERMAL MICROVASCULAR ENDOTHELIAL CELLS



【図 7】

図面代用写真(カラー)

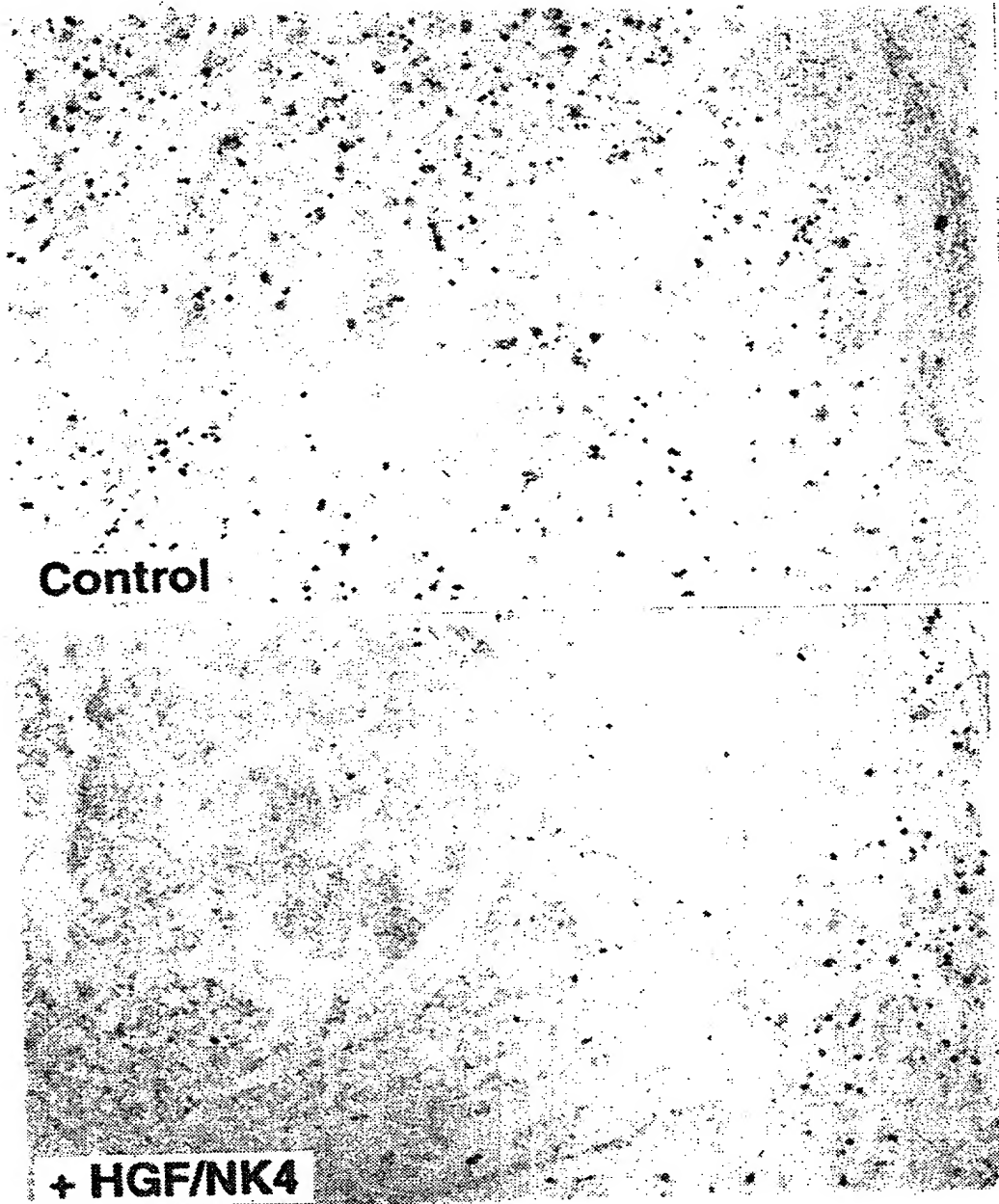
INHIBITION OF ANGIOGENESIS IN CAM BY HGF/NK4



【図8】

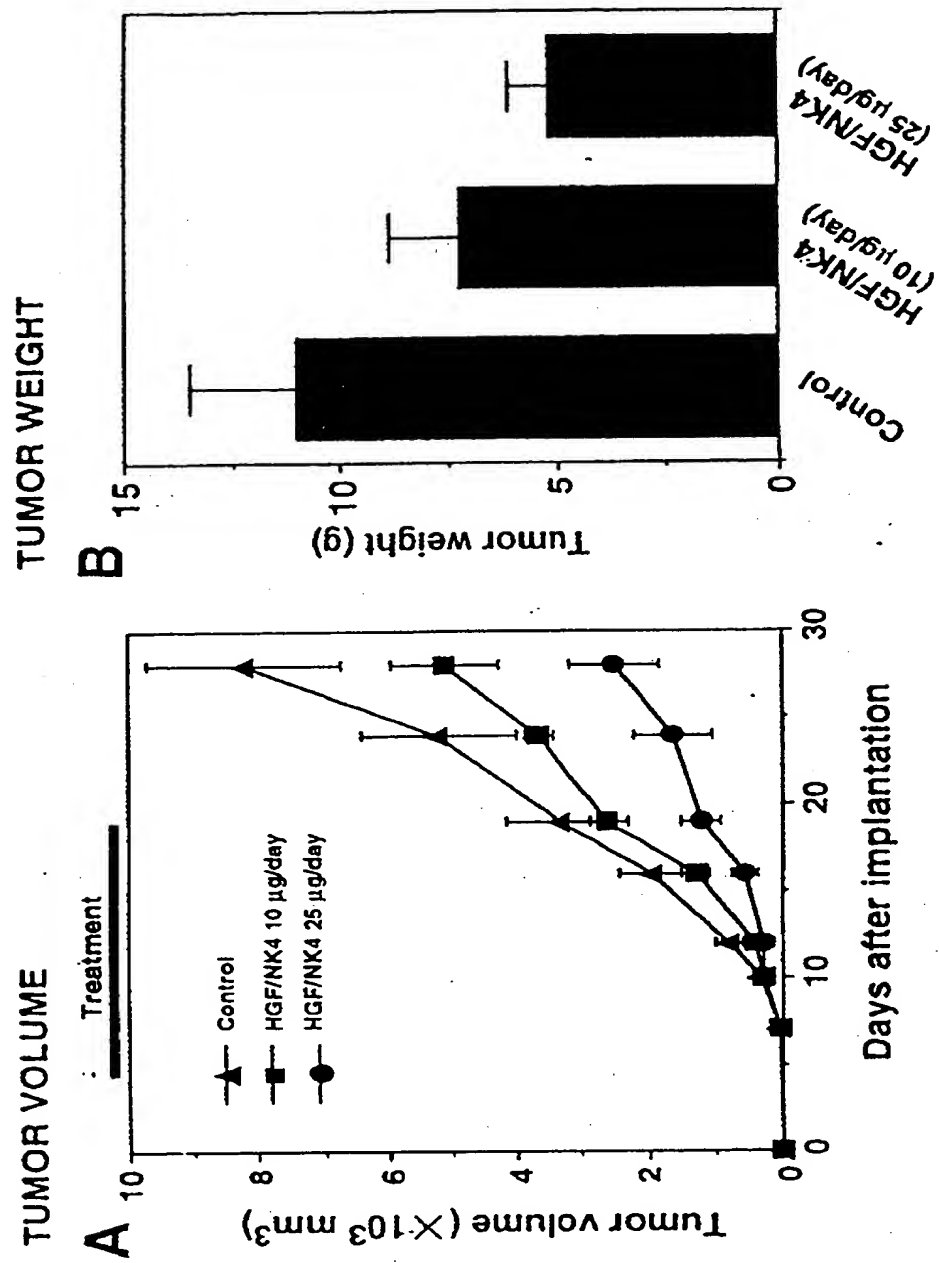
図面代用写真(カラー)

INHIBITION OF TUMOR ANGIOGENESIS IN GB-d1 TUMOR TISSUES BY HGF/NK4

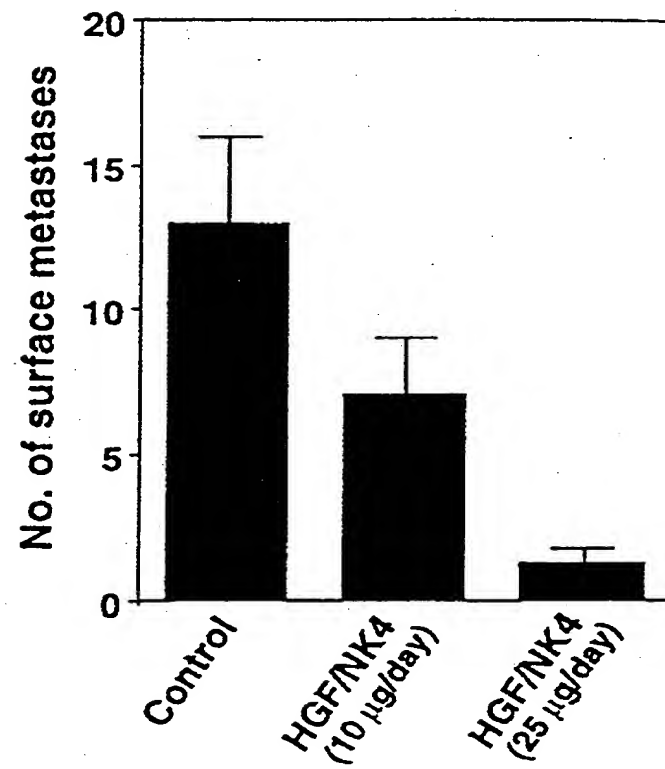


* Immunostaining for endothelial cell-specific
von Willebrand factor antibody.

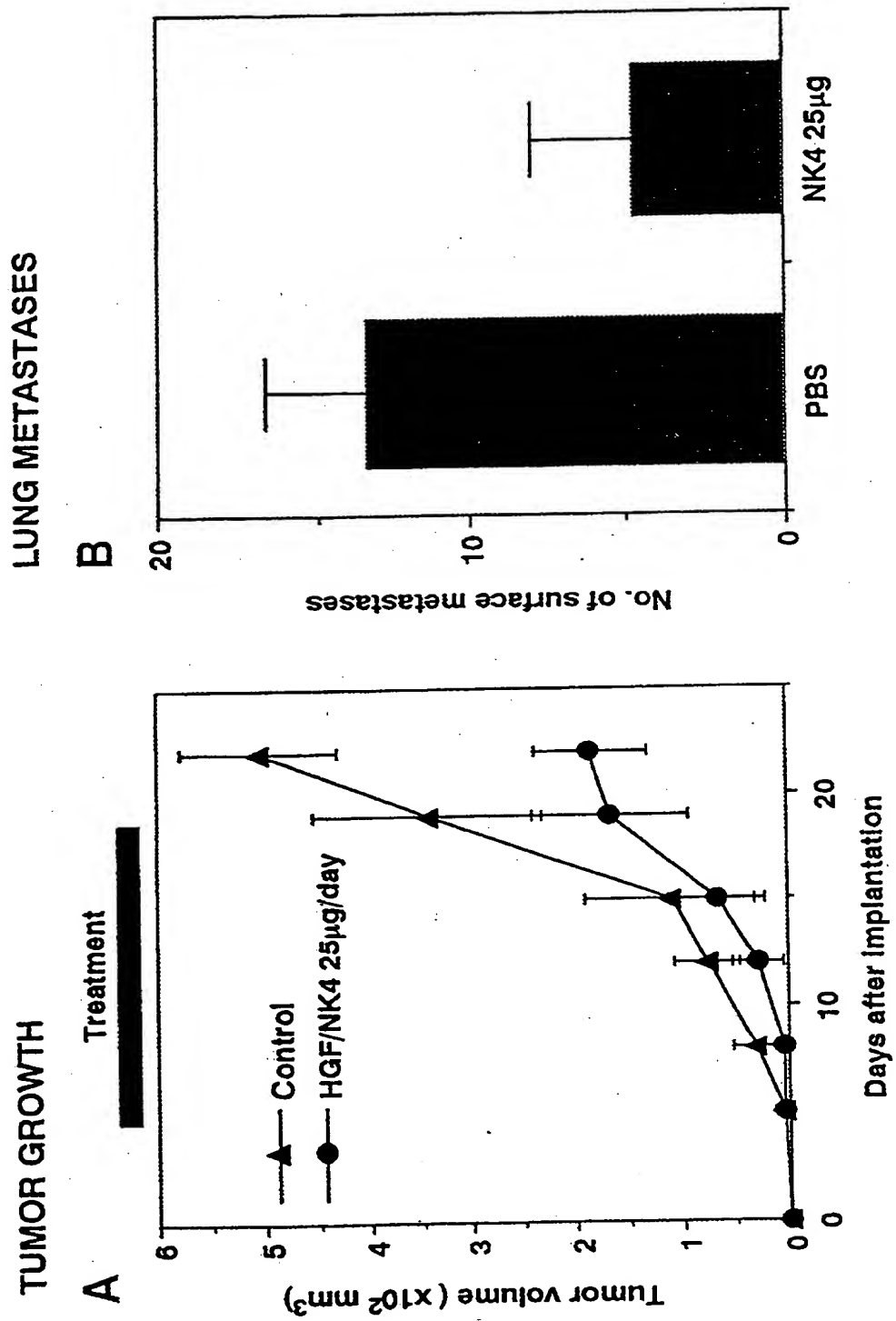
【図 9】



【図 10】



【図 11】



【書類名】 要約書

【要約】

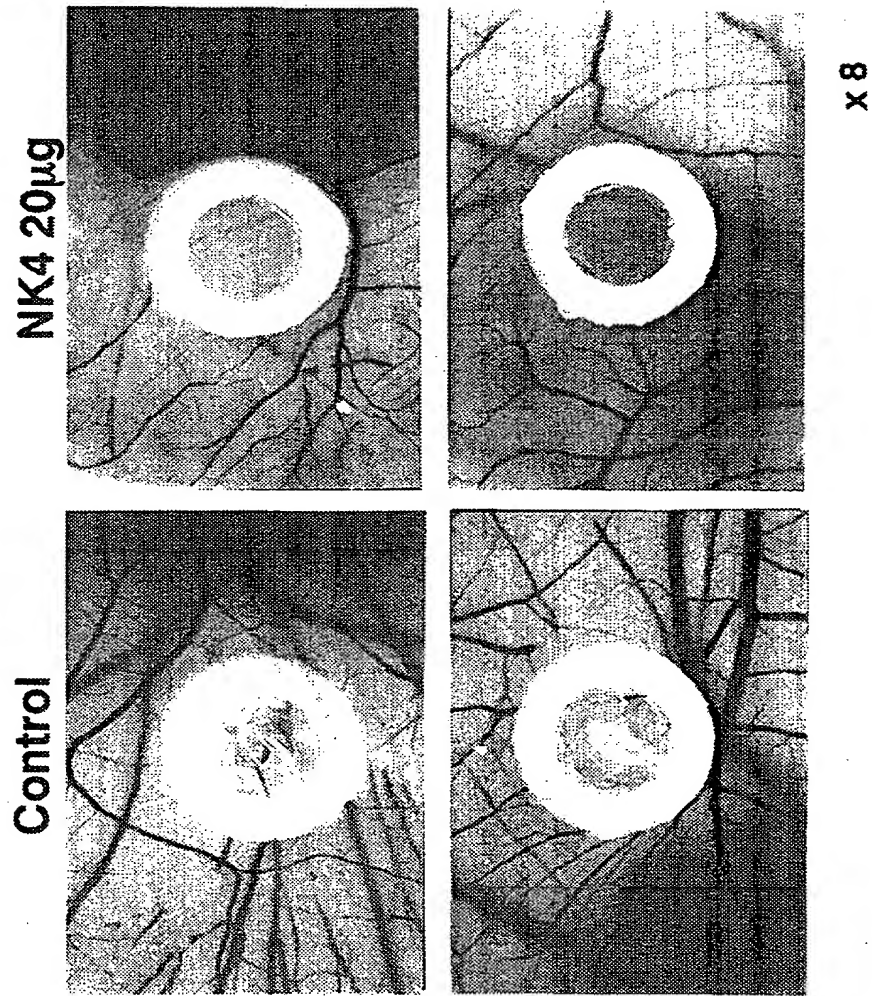
【課題】 新規な血管新生抑制因子、種々の疾患の予防及び治療に役立つ血管新生抑制剤の提供。

【解決手段】 以下の (a) 又は (b) に記載されるポリペプチドを有効成分として含有する血管新生抑制剤： (a) HGF (Hepatocyte growth factor) のPyrGlu³²～Val⁴⁷⁸からなるアミノ酸配列を有するポリペプチド、 (b) (a) のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつc-Met/HGFレセプターを介するHGFの作用に対してアンタゴニスト活性を有するポリペプチド

【選択図】 なし

【参考写真1】

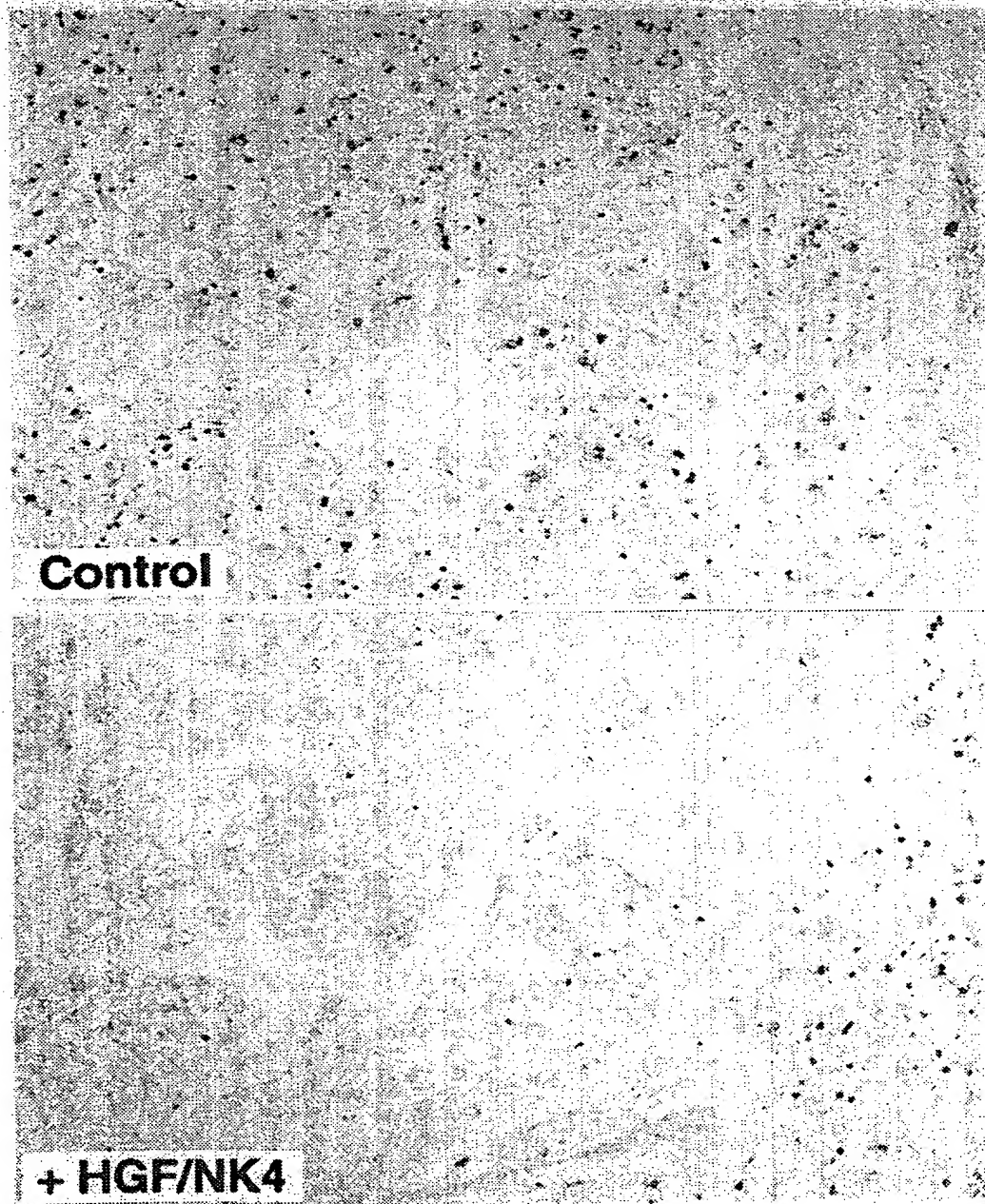
INHIBITION OF ANGIOGENESIS IN CAM BY HGF/NK4



カラー写真

【参考写真2】

**INHIBITION OF TUMOR ANGIOGENESIS
IN GB-d1 TUMOR TISSUES BY HGF/NK4**

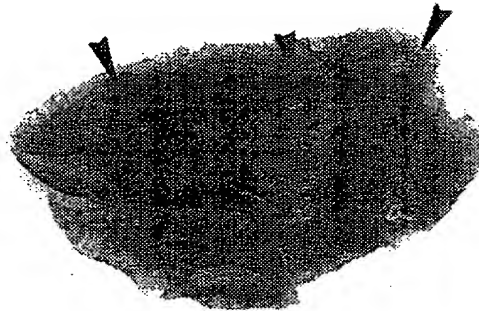


* Immunostaining for endothelial cell-specific
von Willebrand factor antibody.

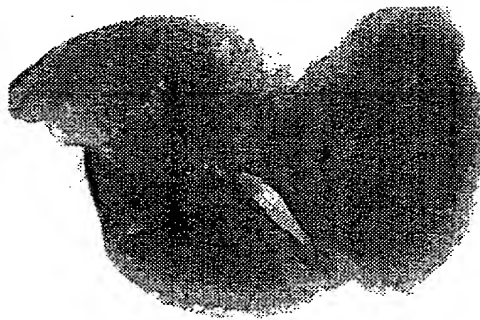
カラー写真

【参考写真3】

Control



HGF/NK4 25 μ g/day



カラー写真

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 591115073

【住所又は居所】 大阪府高槻市高見台4-1

【氏名又は名称】 中村 敏一

【代理人】 申請人

【識別番号】 100065215

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番1号 北浜T
NKビル 三枝国際特許事務所

【氏名又は名称】 三枝 英二

【選任した代理人】

【識別番号】 100076510

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番1号 北浜T
NKビル 三枝国際特許事務所

【氏名又は名称】 掛樋 悠路

【選任した代理人】

【識別番号】 100086427

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番1号 北浜T
NKビル 三枝国際特許事務所

【氏名又は名称】 小原 健志

【選任した代理人】

【識別番号】 100090066

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番1号 北浜T
NKビル 三枝国際特許事務所

【氏名又は名称】 中川 博司

【選任した代理人】

【識別番号】 100094101

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番1号 北浜T
NKビル 三枝国際特許事務所

【氏名又は名称】 館 泰光

【選任した代理人】

【識別番号】 100099988

【住所又は居所】 大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番1号 北浜T
NKビル 三枝国際特許事務所

【氏名又は名称】 斎藤 健治

【選任した代理人】

【識別番号】	100105821
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番1号 北浜T NKビル 三枝国際特許事務所
【氏名又は名称】	藤井 淳
【選任した代理人】	
【識別番号】	100099911
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番1号 北浜T NKビル 三枝国際特許事務所
【氏名又は名称】	関 仁士
【選任した代理人】	
【識別番号】	100108084
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番1号 北浜T NKビル 三枝国際特許事務所
【氏名又は名称】	中野 睦子
【選任した代理人】	
【識別番号】	100109438
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番1号 北浜T NKビル 三枝国際特許事務所
【氏名又は名称】	大月 伸介
【選任した代理人】	
【識別番号】	100109427
【住所又は居所】	大阪府大阪市中央区道修町1丁目7番1号 北浜T NKビル 三枝国際特許事務所
【氏名又は名称】	鈴木 活人
【提出された物件の記事】	
【提出物件名】	委任状（代理権を証明する書面） 1 参考写真 1

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [591115073]

1. 変更年月日	1997年11月18日
[変更理由]	住所変更
住 所	大阪府高槻市高見台4-1
氏 名	中村 敏一